



Desenho de *Primers* Degenerados através de Bioinformática

Edna Maria Morais Oliveira¹
Tatiane Corrêa de Oliveira²
Andressa Moreira de Souza³
Thiago Ferreira dos Santos⁴
Ivanilda Santos de Lima⁵

Introdução

A reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) é uma ferramenta muito utilizada na área de biologia molecular, pois é um método sensível e aplicável em diferentes matrizes, dependendo apenas da qualidade do DNA extraído. A elevada sensibilidade desse método é proporcionada pelos *primers* ou oligonucleotídeos iniciadores utilizados durante a reação. Os *primers* são sequências únicas de nucleotídeos capazes de se anelar às suas sequências alvo de DNA durante a PCR.

Os *primers* são desenhados baseando-se no código genético (DNA molde) da espécie que se deseja estudar. O gene de interesse é selecionado e, com a ajuda de programas de bioinformática como o GeneFisher (GIEGERICH; MEYER, SCHLEIERMACHER, 1996), alguns pares são gerados como opções. Quando se pretende estudar espécies cujo código genético não foi ainda sequenciado ou quando há a presença de polimorfismos, a etapa de desenho de *primers* se torna ainda mais desafiadora, uma vez que a sequência exata de nucleotídeos codificadora de cada informação não é conhecida. Como solução, utiliza-se *primers degenerados* (INSERT et al., 2013).

Devido à alta degenerescência do código genético (Fig. 1), diferentes trincas de nucleotídeos podem codificar uma mesma proteína. Oligonucleotídeos

iniciadores são denominados *degenerados* quando são formados por um conjunto de sequências, ao invés de uma única sequência específica, de forma a cobrir todas as possibilidades de códons responsáveis pela síntese de uma proteína.

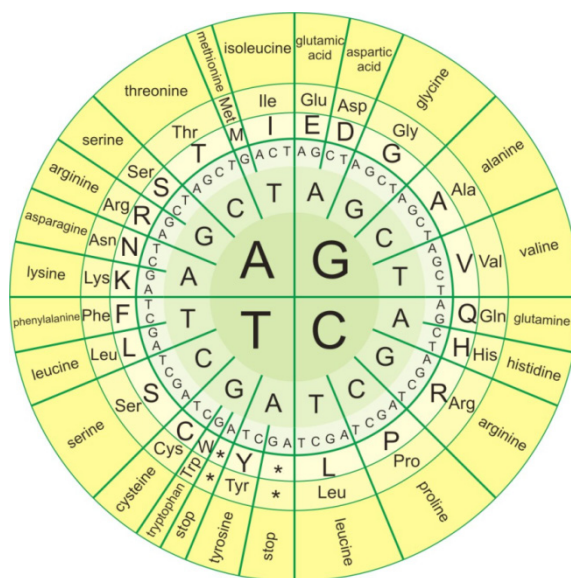


Figura 1. Código Genético

(Fonte: http://prismacentifico.files.wordpress.com/2013/11/genetic_code.jpg)

¹ Engenheira Química, D.Sc. em Bioquímica, pesquisadora da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

² Química com atribuições tecnológicas, assistente da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

³ Química Industrial, M.Sc. em Química Ambiental, analista da Embrapa Agroindústria de Alimentos, Rio de Janeiro, RJ

⁴ Biólogo, M.Sc. em Ciências de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ

⁵ Nutricionista, bolsista do CNPq-Brasil, Rio de Janeiro, RJ

Para desenhar esse tipo de *primer* é preciso realizar uma pesquisa do alvo na base de dados do NCBI (NATIONAL CENTRE FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014) e encontrar a sequência codificadora de uma determinada proteína de interesse. Através dos programas BLAST - *BASIC local alignment search tool* ou ClustalW (2014), diferentes sequências podem ser alinhadas e comparadas para que seja possível reconhecer a região de maior similaridade entre as espécies pesquisadas. Uma vez conhecida a região que guarda maior semelhança entre as espécies (região conservada) pode-se, então, utilizá-la para o desenho dos *primers*, mantendo-se as regiões idênticas e considerando-se todas as opções de nucleotídeos nas regiões que diferem entre si. Por exemplo, o aminoácido “KEA” pode ser codificado por “AAAGAAGCA”, “AAGGAGGCT” ou “AAGGAAGCG” dentre outras combinações de nucleotídeos. Porém, todas essas possibilidades podem ser representadas pelo *primer* degenerado “AARGARGCN”, de acordo com a representação padrão da IUPAC (Tabela 1).

Tabela1. Representação padrão da IUPAC

Símbolo	Bases representadas
R	A, G
Y	C, T
M	A, C
K	G, T
S	C, G
W	A, T
H	A, C, T
B	C, G, T
V	A, C, G
D	A, G, T
N	A, C, G, T

Como os *primers* degenerados não são uma única sequência de nucleotídeos mas, sim, uma mistura de sequências, um aspecto importante que deve ser considerado é o nível de degenerescência na extremidade 3’ do *primer*, uma vez que é nessa região que se inicia a amplificação através da ação da polimerase durante a PCR. Dessa forma, evita-se que amplificações indesejáveis sejam provocadas pela não especificidade do oligonucleotídeo (LINHART; SHAMIR, 2002, p. 172-180).

Metodologia

Usando-se como exemplo a proteína NPR1, que está relacionada ao sistema de defesa de vegetais e a estratégia de análise por Bioinformática descrita por Santos e Ortega (2003), a primeira etapa do desenho de *primers* degenerados é a busca da sequência de aminoácidos dessa proteína através da base de dados do NCBI (Fig. 2). Em seguida, através do link *RunBLAST*, localizado do lado direito, na própria página do NCBI, automaticamente visualiza-se o gráfico que representa o alinhamento da sequência da proteína da espécie selecionada, bem como de inúmeras outras semelhantes (Fig. 3).

Regulatory protein NPR1 [Arabidopsis thaliana]

NCBI Reference Sequence: NP_176610.1

[GenPept](#) [Graphics](#)

```
>gi|15222657|ref|NP_176610.1| Regulatory protein NPR1 [Arabidopsis thaliana]
MDTTIDGFADSYEISSTSFVATDNTDSSIVYLAAEQVLTGPDVSALQLLSNSFESVFDSPDDFYSDAKLV
LSDGREVSFHRCVLSARSSFFKSALAAAKKEKDSNNTAAVKLELKEIAKDYEVGFDVTVLAYVYSSRV
RPPPKGVSECADENCCHVACRPVDFMLEVLYLAFIFKIPELITLYQRHLLDVVDKVVIEDTLVILKLAN
ICGKACMKLLDRCKEIIVKSNDVMVSLEKSLPEELVKEIIDRRKELGLEVPKVKKHVSNVHKALDSDDIE
LVKLLLLKEDHTNLDDACALHFAVAYCNVKTATDLLKLDLADVNHNRNPRGYTVLHVAAMRKEPQLILSLLE
KGASASEATLEGR TALMIAKQATMAVECNNIPEQCKHSLKGRLCVEILEQEDKREQIPRDVPPSFAVAAD
ELKMTLLDLN RVALAQRLFPTEAQAAMEIAEMKGTCEFIIVTSLEPDRLTGTRKRTSPGVKIAPFRILEEH
QSRLKALSKTVELGKRFFPRCSAVLDQIMNCEDLTQLACGEDDTAEKRLQKKQRYMEIQETLKKAFSEDN
LELGNSSLTDSTSTSKSTGGKRSNRKLSHRRR
```

Figura 2. Proteína NPR1 da *Arabidopsis thaliana* no formato FASTA
(Fonte: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/15222657?report=fasta>)

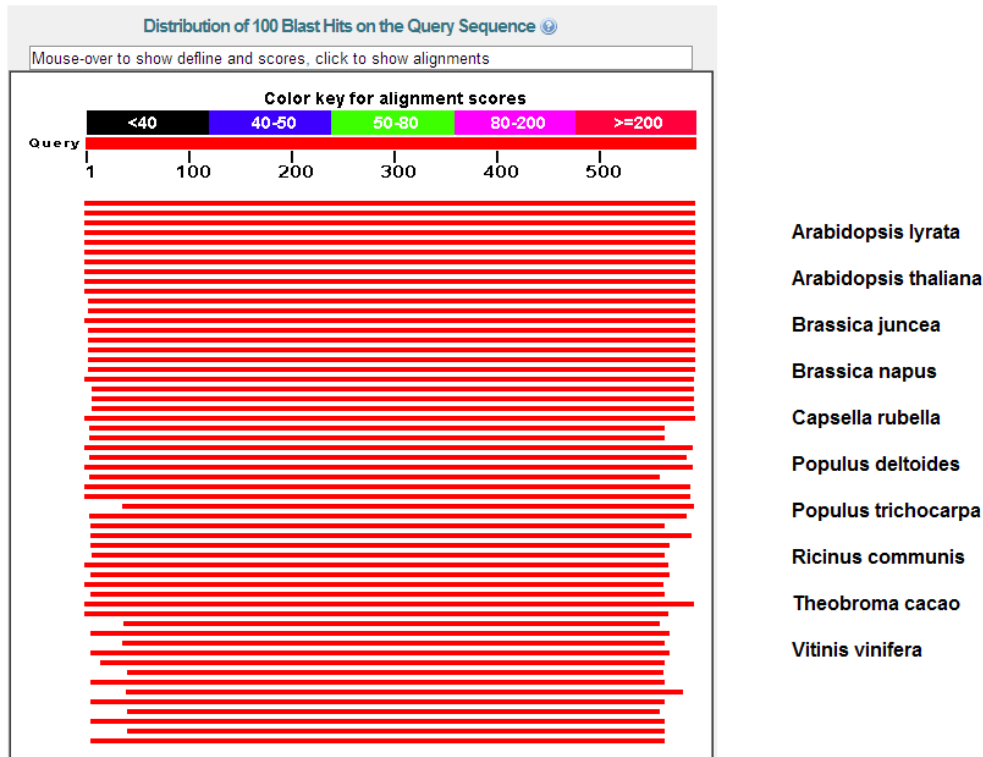


Figura 3. Alinhamento de seqüências através do *BLAST* (Fonte: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Selecionam-se, então, algumas seqüências das espécies listadas no *BLAST* para serem traduzidas através do *EMBOSS Backtranseq* (Fig. 4) e faz-se um novo alinhamento através do *ClustalW* (Fig. 5). Dessa forma, as semelhanças e diferenças entre cada base das seqüências comparadas se tornam mais evidentes.

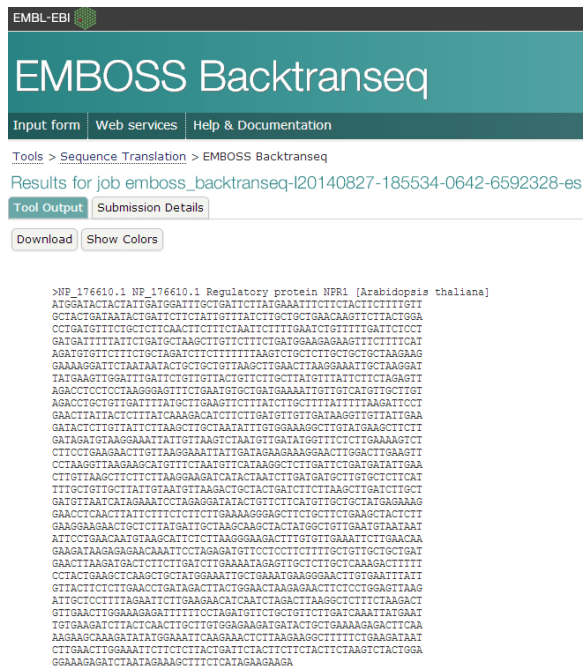


Figura 4. Tradução da proteína
(Fonte: http://www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_backtranseq/)

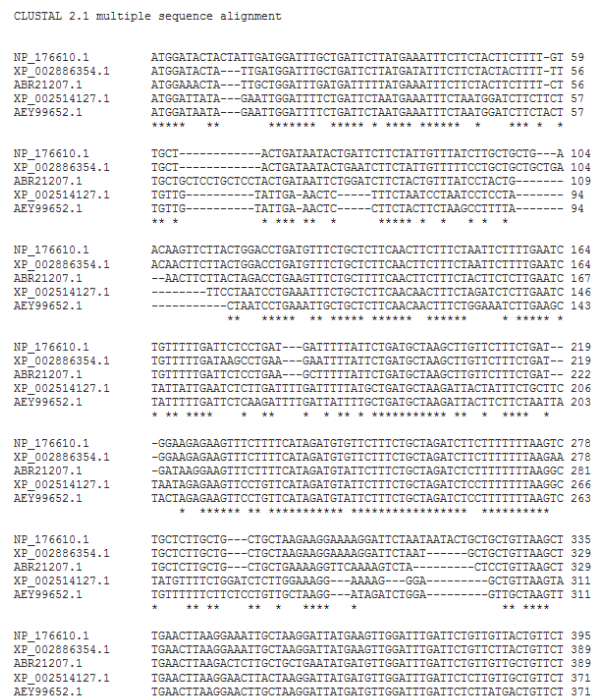


Figura 5. Alinhamento através do ClustalW
(Fonte: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>)

A próxima fase é selecionar a melhor região da sequência (a de maior similaridade entre as espécies comparadas) para ser submetida ao programa *Genefisher* para o desenho dos *primers*. Nos pares de *primers* selecionados, são detectadas as posições onde há maior diferença entre as bases e onde há total semelhança entre as espécies. Dessa forma, deve-se manter a base ou trocá-la pela base degenerada correspondente, respectivamente, de acordo com a representação padrão da IUPAC.

Considerações Finais

Primers degenerados são ferramentas muito úteis quando se deseja estudar espécies que não apresentam o seu código genético sequenciado além das situações onde há alta incidência de polimorfismos. Nesse cenário, pode-se também observar a fundamental importância das ferramentas de bioinformática, as quais trazem praticidade e maior confiabilidade para os resultados. Todos os programas citados neste documento são de livre acesso na internet e têm se mostrado eficientes no desenho e testes para a definição dos pares de *primers* degenerados.

Todavia, além dos cuidados necessários durante o desenho dos *primers*, também é importante observar vários parâmetros reacionais como: concentração de *primers* e de sal e a temperatura de anelamento, com o objetivo de potencializar o sucesso da reação.

Na prática, o uso de *primers* degenerados em estudos relacionados à análise da expressão de genes de vegetais, cujo genoma ainda não foi sequenciado, já é uma realidade na Embrapa Agroindústria de Alimentos. Por exemplo, atualmente, vem sendo desenvolvido um estudo para avaliar, com a ajuda desta técnica, a resistência sistêmica induzida por ácido salicílico em alface, couve-flor e tomate cultivados no Norte Fluminense.

Referência

BASIC local alignment search tool. Disponível em: <<http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 29 ago. 2014.

ClustalW. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>. Acesso em: 29 ago. 2014.

GIEGERICH, R.; MEYER, F.; SCHLEIERMACHER, C. GeneFisher: software support for the detection of postulated genes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON INTELLIGENT SYSTEMS FOR MOLECULAR BIOLOGY, 4.; 1996. Proceedings... BethesdaMD: NCBI. p. 68-77. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8877506>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

ISERTE, J. A.; STEPHAN, B. I.; GOÑI, S. E.; BORIO, C. S.; GHIRINGHELLI, P. D. LOZANO, M. E. Family-specific degenerate primer design: a tool to design consensus degenerated oligonucleotides. In: **Biotechnology Research International**. 2013. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/btri/2013/383646/>>. Acesso em: 28 ago. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/383646>

LINHART, C.; SHAMIR, R. The degenerate primer design problem. **Bioinformatics**, Oxford University Press: Oxford, v. 8, suppl. 1, p. S172-S180. 2002.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

SANTOS, F. R.; ORTEGA, J. M. **Bioinformática aplicada à genômica**. Belo Horizonte, 2003. Manuscrito para capítulo do Biowork IV, 21 p.

Literatura recomendada

DEGENERATE sequences and non-standard bases quick look. Integrated DNA Technologies, 2011. Disponível em: <<http://www.idtdna.com/pages/docs/quick-looks/quick-look---degenerate-sequences-and-non-standard-bases.pdf?sfvrsn=1>>. Acesso em: 28 ago. 2014.

Comunicado Técnico, 208

Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento



Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Agroindústria de Alimentos
Endereço: Av. das Américas, 29.501 - Guaratiba
23020-470 - Rio de Janeiro - RJ
Fone: (21) 3622-9600 / **Fax:** (21) 3622-9713
Home Page: www.embrapa.br/agroindustria-de-alimentos
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição
1ª impressão (2015): tiragem (50 exemplares)

Comitê de Publicações

Presidente: Virgínia Martins da Matta
Membros: Ana Iraidy Santa Brígida, André Luis do Nascimento Gomes, Celma Rivanda Machado de Araujo, Daniela De Grandi Castro Freitas de Sá, Elizabete Alves de Almeida Soares, Leda Maria Fortes Gottschalk, Nilvanete Reis Lima, Renata Torrezan e Rogério Germani

Expediente

Supervisão editorial: Virgínia Martins da Matta
Revisão de texto: Renata Valeriano Tonon
Normalização bibliográfica: Celma R. M. de Araujo
Editoração eletrônica: André Luis do N. Gomes